

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670376

研究課題名(和文) Direct reprogramming法による疾患特異的肝内胆管上皮細胞の作製

研究課題名(英文) Establishment of disease specific intrahepatic biliary epithelial cells by direct reprogramming

研究代表者

上野 義之 (Ueno, Yoshiyuki)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70282126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの口の中から、綿棒でこすった先に着いてくる細胞を用いて、そこに数種類の遺伝子を入れることによって、肝臓の中にある胆管細胞を作成する研究を行いました。遺伝子導入は上手くいき、細胞の形質転換をすることができましたが、残念ながら胆管上皮という性質を獲得するには至りませんでした。しかし、類縁細胞の膵管上皮細胞で認められるアミラーゼ産生が確認されたため、もう少しの工夫で目的の細胞にいたる可能性は高いと思います。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish intrahepatic biliary epithelial cells by direct reprogramming method. Briefly, human fibroblast cells were harvested from oral cavity, and cultured. Thereafter, several genes were introduced using retroviral vector. After adequate screening, cells were evaluated their phenotype, physiologically, biochemically, and molecularly. Our established cells exhibited amylase production, which is regarded as the marker of pancreatic ductal cells. However, our cells did not exhibited the markers as the intrahepatic biliary epithelial cells such as cytokerating 7, bicarbonate production, and expression of biliary transporters. Thus, up to now, our study did not achieve the establishment of aimed cells. Given the fact that pancreatic ductal cells is a similar cells to bile duct cells, further improvement could enables us to develop aimed cells.

研究分野：消化器病学

キーワード：形質転換 線維芽細胞 胆管上皮細胞 ダイレクトリプログラミング

### 1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変(以下 PBC)は原因不明の難治性進行性肝疾患であり、自己免疫機序が病態形成に関与すると想定されているもののその詳細は不明の難治性肝疾患である。しかし、適当な疾患モデルの確立がなされていないため、至適な病態解明や治療モデルが存在しない。また、肝内胆管上皮細胞自体も、肝臓構成実質細胞のうち数%を占めるにすぎないためその分離培養も困難である。これまで申請者を含めたこの分野の研究者は肝内胆管上皮細胞の研究を系統的に行ってきたり、患者の肝臓由来の細胞から胆管上皮細胞の分離培養を試みてきたが、実用に耐えるような手法を確立することが困難な状況である。

一方、近年飛躍的に研究が展開している幹細胞研究の分野では肝臓を構成する細胞の分化誘導法が進歩しており、数多くの報告がなされている。そのうち、最も期待されるのは iPS など幹細胞を用いた分化誘導法であるが、その分化能が多岐にわたるために法令による規制が多い現状がある。しかも、幹細胞をいかに望む細胞にのみ分化させるかという点については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では昨年報告された繊維芽細胞より直接肝細胞に分化される **direct reproduction** 法を改変し、繊維芽細胞より直接胆管上皮細胞に分化させることにより、疾患特異的な胆管細胞を得ることにより、PBC 疾患モデルを *in vitro* において構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

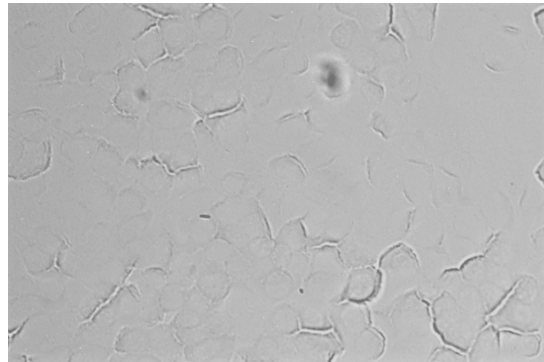
繊維芽細胞からヒト胆管上皮細胞への直接形質転換するために導入する必要がある遺伝子を決定することが最も重要であり、先行する肝細胞への **direct reproduction** で明らかにされた肝幹細胞から肝実質細胞への決定因子 12 因子より 4 種類程度の決定的遺伝子を山中伸哉らが iPS を確立したときと同様の手法(Takahashi et al, Cell 126: 663, 2006)を用いて、1 分子毎のサブトラクション法を用いた。得られた細胞が胆管上皮細胞としての機能を有しているかについては、細胞マーカー(サイトケラチン 7, 19)、胆汁酸トランスporter、セクレチンに対する cAMP 反応性などで検討した。

### 4. 研究成果

健常ボランティアの口腔内スワブより、繊維芽細胞をコラゲナーゼ及びトリプシン処理したのみ初代培養した。70%コンフルエントとなった時点で、遺伝子導入をおこなった。レトロウイルスベクターを用いて、Hex, Gata4, Gata6, Tbx3, Hnf1a, Hnf1b, Foxa1, Foxa2, Foxa3, Hnf4a, Hnf6, Fah というヒト肝幹細胞から肝実質細胞への分化の際に重要とされる遺伝子群の中から、1 分子ずつの削り込みを行った。

初代培養後に三日月の形状をしていた口腔内繊維芽細胞は、遺伝子導入後にその形態が変化し、一部は上皮細胞上の形態を示した。

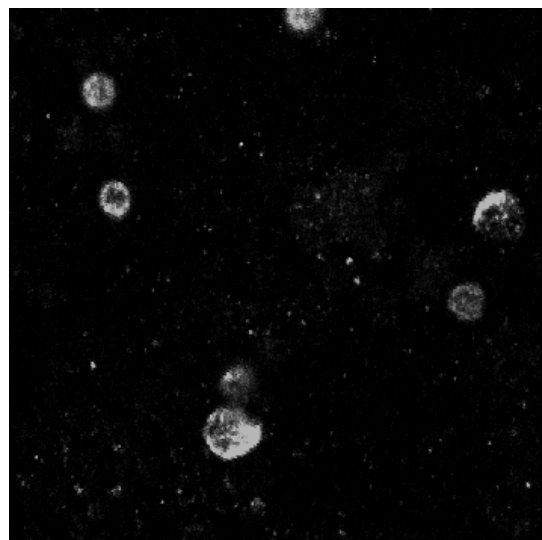
その中でも Foxa3, Hnf4a を導入した細胞では上皮細胞用の形態を示した。(下図)



さらに導入する遺伝子の種類を変えることにより、形態や細胞分裂はさらに変化した。

そのうち、形態学的に肝内胆管上皮細胞に近いものを取り出して、細胞生物学的な検討を行った。

その結果、サイトケラチン 7 染色を行ったが陽性となる細胞株は得られなかった。さらに、イムノブロットングを行い、サイトケラチンの他に胆管上皮細胞の特性を検討したが、今回の研究では胆管上皮細胞としての特性を見せたクローンは得ることができなかった。(下図)



しかし、陰性細胞のうち一部の細胞でアミラーゼ産生を認める細胞を見出した。(下図)



したがって、類縁細胞である膵管上皮細胞への分化傾向のある細胞を得たとも考えられ、この遺伝子導入に近いコンディションをさらに検討した。

しかし、導入する遺伝子の数を減らすと、もとの三日月状の形状に近い形態となり、導入する遺伝子の数を増やすと、アミラーゼ産

生も落ちていくというジレンマに陥った。

さらに、条件を変えていくと、得られる形質転換の結果が一定しないという状態に陥った。その原因として、採取した線維芽細胞が培養系を続けていくうちに形質転換していたことが判明し、以降の実験よりある一定の継代以内の細胞を用いることとした。

しかし、当初の実験で得られた膵管上皮細胞様の細胞を再現することに非常に難渋し、本来の目的である肝内胆管上皮細胞に近い細胞を作成したといえる成果を得ることができなかった。

したがって、本研究での成果の要約として、

- ①使用する線維芽細胞の継代法、
  - ②遺伝子導入の方法（レトロウイルスベクター）
  - ③形質転換した細胞の評価法、
- については一定の成果を得ることができた。

しかし、未解決の問題として、

- ①遺伝子導入する遺伝子の数、
  - ②導入する遺伝子の組み合わせ
- については、解決していない。

膵管上皮細胞と胆管上皮細胞は、同じ胆道系の上皮細胞として共通の項目をもっている。特に膵管上皮細胞の分化には Notch シグナリングの重要性が他の研究者から報告されており、本研究でも Notch-Hes1 経路を調整することにより、過分に膵管上皮細胞に分化してしまうことを制御できるのではないかと仮定してその部分に研究を行ってきた。

しかしながら、膵管上皮細胞としては、アミラーゼ産生を上述のように認めたものの重炭酸についての分泌は確認できなかったこと、トリプシンなどについての耐性が証明できず、膵管上皮細胞として妥当な生理学的特性を有していると結論できなかった。

遺伝子導入の効率が悪いことも懸念し、コントロールの遺伝子を導入して導入効率も検証したが、その点については問題を認めなかった。遺伝子導入法もレトロウイルスベクターの他にエレクトロポレーション法も検討したが、レトロウイルスベクターを用いた方が主義的に安定していて、しかも複数の遺伝子を導入する設定もこの方法が選りすぐれていた。したがって、主義的な問題が存在したと仮定するより、導入する遺伝子の数と組み合わせに未だ問題が残っていることを示唆していた。

さらに今回の研究ではヒト線維芽細胞を用いていたが、先行研究と同じ条件で肝細胞への分化を検討したが、その条件でも得られる細胞の形質は一定とならず、その結果の「揺れ」が使用した細胞の問題なのか、導入する条件の違いなのか判別することが困難であった。

最終的な解決法として、すでに細胞株化した線維芽細胞を用いるなどの手法も考えられたが、本研究の大きなアドバンテージとして

患者個体の細胞に由来する細胞をダイレクトリプログラミング法で作成するという大目的が存在していたため、初代培養細胞に絞って検討を続けた。

しかし、ボランティアの条件（年齢、精査、など）によっても得られた線維芽細胞の増殖速度が異なっており、すべての実験で共通する基礎条件を確立するには至らなかった。

しかし本研究において、遺伝子導入する条件、用いる細胞のコンディショニングなどについて一定の成果を得たため、将来の実験の基盤となる成果を得たと考える。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1) Katsumi T, Ninomiya M, Nishina T, Mizuno K, Tomita K, Haga H, Okumoto K, Saito T, Shimosegawa T, Ueno Y: MiR-139-5p is associated with inflammatory regulation through c-FOS suppression, and contributes to the progression of primary biliary cholangitis. Lab Invest. Nov 2016; 96(11): 1165-1177 査読有り

2) 上野 義之, 坂本 直哉, 丸澤 宏之, 有井 滋樹: 【新規技術が創り出す肝疾患診療のスペクタクル】 新規の技術はわれわれをどこに導くのか. 肝・胆・膵. 2016 年 11 月; 73(5): 797-810 査読無し

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/IntMedII/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 義之 (Yoshiyuki Ueno)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70282126

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )